55–58

2540(10)

动 物 学 研 究 1994, 15 (1): 55—58 CN 53-1040 / Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

树鼩脑 β–内啡肽能神经元胞体和纤维分布的研究

罗裕群 彭 宁 杨文光 张唯嘉
(广西医学院灵长类研究室 南宁 530027)

A

摘要 本文用免疫组织化学方法和免疫电镜方法对 14 只树鼩脑 β–内啡肽能神经元胞体和纤维的分布及其在细胞器的定位进行了研究。结果表明，本文首次报道在 Broca 斜角带观察到 β–内啡肽免疫反应阳性神经元胞体，电镜观察到 β–内啡肽免疫反应物质定位于大颗粒囊泡内的小颗粒上和粗面内质网上。下丘脑弓状核及其附近区域观察到 β–内啡肽免疫反应阳性神经元胞体。在室周区、室旁核、第 3 脑室室管膜下层及室管膜上皮细胞间、内侧基底下丘脑及其外侧区、正中隆起内带和外带都可见到 β–内啡肽免疫反应阳性纤维和串珠状的膨体。对 β–内啡肽的释放途径及其调节因素作了探讨。

关键词 β–内啡肽、免疫组织化学、树鼩，Broca 斜角带

脑，内啡肽，神经元，纤维

β–内啡肽(β–endorphin, β–END)由 Li 等(1976)从骆驼脑垂体分离并弄清其化学结构，Eipper 等(1978)应用免疫组织化学方法定位于大鼠腺垂体前叶和中间叶，Zakarian 等(1979)、Mezey 等(1985)和包新民等(1990)等国内外学者先后报道了在大鼠下丘脑弓状核及其附近区域发现 β–内啡肽能神经元胞体，还报道 β–内啡肽免疫反应阳性纤维分布于第 3 脑室室管膜下层、室管膜上皮细胞之间，脑底软脑膜中、室周区、室旁核、内侧基底下丘脑、下丘脑背内侧核、正中隆起内带、前乳头体核以及斜角带(李乾五等，1991)，他们的研究都是以啮齿目大鼠为实验动物，而本研究用的动物为树鼩，但树鼩脑 β–内啡肽神经元胞体和纤维的分布迄今未见报道，前人报道 β–内啡肽定位于细胞浆内和分泌颗粒内，但未见报道在细胞器和分泌颗粒的定位问题。β–内啡肽能促进学习和记忆，β–内啡肽的异常又可导致精神紊乱，并可用 β–内啡肽进行治疗；β–内啡肽是内源性吗啡样镇痛物质，其镇痛效果比脑啡肽强 100 倍(朱长庚，1985)。我们报道了树鼩腺垂体 β–内啡肽的分布和定位(罗裕群等，1993)，现又报道 β–内啡肽能神经元胞体和纤维在树鼩脑的分布以及在细胞器和分泌颗粒的定位，为今后有关方面对树鼩脑 β–内啡肽的生理学和临床医学研究提供必要的形态学基础。

1 材料和方法

树鼩(*Tupaina belangeri*) 12 只，体重 97—175 g，雌雄不拘，第 1 次手术，用 20%乌

本文 1992 年 11 月 21 日收到，1993 年 6 月 14 日修回

拉坦(5 ml／kg)腹腔注射，麻醉后在定位仪上按杨文光等(1990)方法定位，将秋水仙素4 μl(20 μg／μl)注入侧脑室内，48 h后再次麻醉，开胸暴露心脏，经左心室——外主动脉内灌流固定：灌洗液为0.1 M／L磷酸缓冲液(PB)100—150 ml，pH7.4；固定液为300—400 ml(内含2%多聚甲醛，6.7%苦味酸、0.2M／L的PB，pH7.4)。揭开颅盖，在定位仪上按APO平面前后作额状切成厚脑块5 mm，后固定于上述固定液内置4℃冰箱内24 h，厚脑块作冰冻连续额状切片，片厚为25 μm，按Sternberger等(1970)报道的过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(PAP)技术步骤进行。(1)切片先用0.3%H_2O_2—甲醇溶液预处理15 min；(2)再用0.2%Triton X-100和5%正常猪血清于37℃预处理30 min；(3)兔抗β-END血清(INC公司；1：2000)于37℃孵育切片1 h后移置4℃冰箱内72 h；(4)猪抗兔IgG(Dakopatts公司，1：100)于37℃孵育切片30 min后移入4℃冰箱内2 h；(5)兔PAP复合物(Dakopatts公司，1：100)于37℃孵育切片30 min后移置4℃冰箱内1 h；(6)切片入DAB／H_2O_2(0.05%／0.3%)呈色反应10 min。每步骤后均用PBS洗涤3次、然后脱水、透明、封片，光镜观察、照相和测量。

对照试验：(1)置换试验　用正常兔血清代替β-END抗血清，按上述免疫反应步骤进行。(2)吸收试验　用人工合成的β-END稀释液与β-END抗血清成1：1体积，充分混合，置4℃冰箱内48 h，离心取上清液孵育切片，按上述免疫反应步骤进行。

免疫电镜实验　2只树鼩，体重101—150 g，除固定液内加0.1%的戊二醛外，实验方法同上。呈色后光镜观察下切取β-END免疫反应阳性的弓状核及其附近区域组织作1%锇酸固定45 min，升度酒精脱水、用环氧树脂618平板包埋，超薄切片，作铀、铅染色，H-500透射电镜观察照相。

2 结果

2.1 β-内啡肽免疫反应阳性神经元胞体的分布

本文首次发现β-END免疫反应阳性神经元胞体分布于Broca斜角带的垂直带和水平带、垂直带的免疫反应阳性胞体呈梭形、圆形，较小(12—15 μm)，β-END免疫反应阳性胞体长轴呈背腹方向排列(图版I：1a，b)，水平带的免疫反应阳性胞体呈梭形和多角形，较大(15—20 μm)，其胞体的长轴呈水平方向排列(图版I：2a，b)，从垂直带到水平带其胞体有从小到大、形状从圆形到梭形到多角形之变化。此外，在下丘脑弓状核，内侧基底下丘脑观察到β-END免疫反应阳性胞体(图版I：3)。

2.2 β-END免疫反应阳性纤维的分布

我们在室周区、室旁核、第3脑室室管膜下层、室管膜上皮间、内侧基底下丘脑及其背外侧区、正中隆起内带和外带清晰地观察到β-END免疫反应阳性神经纤维，呈串珠状结构(图版I：4)。

2.3 对照试验结果均为阴性，说明本实验具有一定的免疫特异性。

2.4 免疫电镜实验结果

β-END免疫反应阳性物质定位于大颗粒囊泡内的小颗粒上和粗面内质网上(图版I：5、6)。

3 讨论

β-END，ACTH，α-MSH 均来自同一前体——前阿黑皮素，本文只探查 β-END 一种肽物质在树鼩下丘脑及其邻近区域的分布，光镜观察到 β-END 免疫反应阳性胞体存在于 Broca 斜角带，电镜观察到 β-END 免疫反应物质定位于大颗粒囊泡内的小颗粒上和粗面内质网上，同我们在腺垂体观察到的一样，文献均未见报道。β-END 免疫反应阳性纤维的分布与上述作者关于大鼠的报道大体上相似，其分布可能与释放途径有关：(1)分布于第 3 脑室室管膜上皮细胞之间的 β-END 神经末梢可能将 β-END 直接释放入第 3 脑室腔的脑脊液中，这是一条释放途径；(2)分布于正中隆起外带毛细血管旁的神经末梢释放的 β-END 可能直接进入垂体门脉系统，以调控垂体功能，这是另一条释放途径。但其释放机制未见报道。

室旁核为催产素和血管加压素神经内分泌细胞集中的部位，分布于此核中的 β-END 神经末梢与这些神经内分泌细胞之间可能形成突触，以调节催产素和血管加压素的产生和释放。

β-END 是目前已知的最强的内源性吗啡样镇痛物质，它的产生和释放是受其他激素调节的，如胃泌素(gastrin，1991)或胃泌素释放肽(gastrin releasing peptide，1991)或 δ-阿片受体激动剂[DADLE (D-Ala、D-Leu-enkephalin，1990)]注入脑室均能使在体或离体的脑垂体前叶增加 β-END 的释放，这些均提示 β-END 的产生和释放是受某种激素影响并通过兴奋受体而实现的。β-END 神经元是否接受其他神经末梢的调节，有待研究。

图 版 说 明

图版 I

1a：Broca 斜角带的垂直带内的 β-END 能神经元胞体．×10 （A10 切片）．

1b：1a 图 β-END 能神经元胞体放大．×100

2a：Broca 斜角带的水平带内的 β-END 能神经元胞体．×10 （A10 切片）．

2b：2a 图 β-END 能神经元胞体放大．×100

3：下丘脑弓状核并延伸至腹内侧核的腹外侧部，示 β-END 免疫反应神经元胞体

4：正中隆起内、外带的串珠状的 β-END 免疫反应阳性纤维　（A6.5 切片）．×400

5，6：免疫电镜照片．图5为β-END免疫反应物质定位于大颗粒囊泡内的小颗粒上(箭头示)；图6为β-END免疫反应物质定位于粗面内质网上(箭头示)．

参 考 文 献

朱长庚．1985．类阿片肽系统．神经解剖学杂志，1(2)：85．

包新民，舒斯云．1990．大鼠下丘脑中前阿黑皮素来源的肽能神经元(ACTH、β-END，α-MSH)胞体和纤维的分布和比较．神经解剖学杂志，6(1)：43．

李乾五等．1991．大鼠脑斜角带中5-羟色胺，酪氨酸羟化酶、催产素载体蛋白、内啡肽和促性腺激素释放激素系统的分布关系．解剖学报，22(增刊)

杨文光等．1990．中缅树鼩、广西猕猴脑立体定位图谱．广西科技出版社．

许荣焜等．1991．胃泌素对垂体前叶催乳素和β-内啡肽分泌的影响．基础医学与临床，11(5)：17．

许荣焜等. 1991 胃泌素释放肽调节前叶垂体催乳素和β-内啡肽分泌的研究. 基础医学与临床, 11(6): 45

许荣焜等. 1990. δ-阿片受体激动剂DADLE(D-Ala. D-Leu-enkephalin)对β-内啡肽和催乳素释放的影响. 基础医学与临床, 10(4): 31.

罗裕群等. 1993. 树鼩腺垂体β-内啡肽细胞的免疫细胞化学与免疫电镜研究. 解剖学杂志, 16(1): 9.

Eipper B A, Mains R. 1978. Existence of a commen precursor to ACTH and endorphin in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. *J. Supramol. Struct.*, **8**: 247

Li CH, Chung D. 1976. Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. Droc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**: 1145.

Mezey E *et al.* 1985. Distribution of the proopiomelanocortin derived peptides Adreno-corticotrope Hormone, α-Melanocyte-stimulating Hormone and β-endorphin (ACTH, α-MSH, β-END) in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, **328**(2). 341.

Schwartzberg D G, Nakane P K. 1981. Pro-ACTH / endorphin antigenicities in medullary neurons of the rat. *Soc. Neurosci.* (Abstracts), 7. 224.

Sternberger L A *et al.* 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry -- preparation and proporties of soluble antigenantibody complex (HRP-anti-HRP) and its use in identification of spirochetes. *J Histoche. Cytochem.*, **18**(5): 315.

Zakarian S, Smyth D. 1979 Distribution of active and inactive froms of endorphin in rat pituitary and brain. Prac. Natl. Acad. Sci U S. A. **76**: 5972.

STUDIES ON THE DISTRIBUTION OF THE IMMUNOREACTIVE NEURONAL PERIKARYA AND FIBERS OF THE β-ENDORPHIN IN THE BRAINS OF *Tupaia belangeri*

Luo Yuqun Peng Ning Yang Wenguang Zhang Weijia

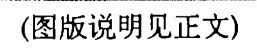
(Primate Institute, Guangxi Medical College, Nanning 530027)

Abstract

In the present paper, immunohistochemical and immunoelectronic microscopic methods was used to research the distribution of the β-END neuronal perikarya and fibers in the brains of 14 *Tupaia belangeri*, as well as its the localization of the organellae, the result showed that immunoreactive neuronal perikarya of the β-END in the diagonal band of Broca were first reported in this paper. The electronic microscopic observation showed that the positive products of immunoreactivity to β-END antiserum are located at the small pellets within the large granular vesicles and scattered on the rough surfaced endoplasmic reticulum. Immunoreactive neurons perikarya to β-END antiserum in the hypothalamus arcuate nucleus and its surrounding areas were visualized by light microscopy. Immunoreactive positive fibers and beaded varicosities to β-END antiserum were found in the periventricle areas, the paraventricle nucleus, the vicinity of the ependymal layer of the third ventricle and ependymal surface, mediobasal hypothalamus and its lateral areas, and in the internal and external layer of the median eminence. The release ways and its regulative factors of the β-END are discussed in the paper.

Key words β-endorphin, Immunohistochemistry and immunoelectronic microscopy, *Tupaia belangeri*, Nucleus fasciculi diagonalis Broca

Luo Yuqun *et al*.: Studies on the distribution of the immunoreactive neuronal perikarya and fibers of the β－endorphin in the brains of *Tupaia belangeri*


(图版说明见正文)